

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 9 月 12 日 (12.09.2003)

PCT

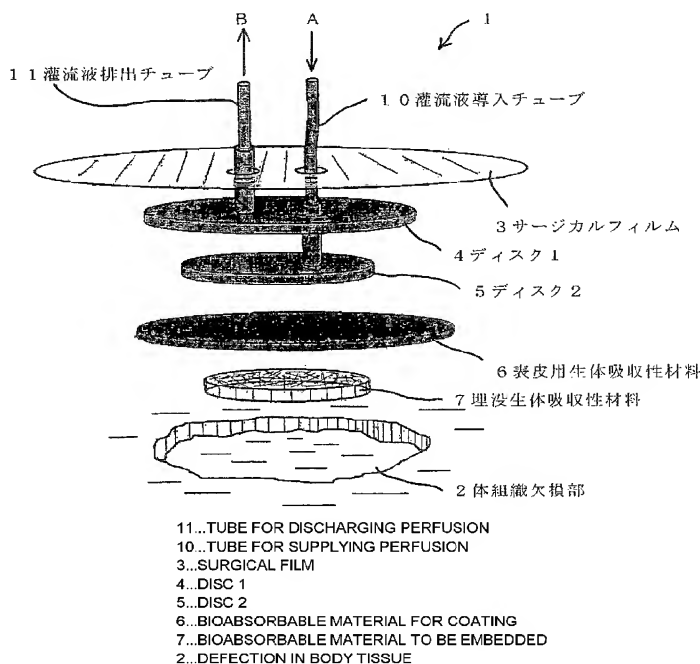
(10) 国際公開番号
WO 03/074100 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61L 27/38, C12N 5/00 // C12M 3/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP03/02501
- (22) 国際出願日: 2003 年 3 月 4 日 (04.03.2003)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2002-57129 2002 年 3 月 4 日 (04.03.2002) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社ネクスト (NEW X-NATIONAL TECHNOLOGY K.K.) [JP/JP]; 〒150-0002 東京都渋谷区渋谷3-18-4 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 茂樹 (SUZUKI, Shigeki) [JP/JP]; 〒154-0001 東京都世田谷区池尻4-22-13 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 稲葉 良幸, 外 (INABA, Yoshiyuki et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号37森ビル 8階 TMI総合法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CN, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: CLOSED CELL CULTURE SYSTEM

(54) 発明の名称: 閉鎖型細胞培養システム



(57) Abstract: It is intended to provide a tissue cell culture system whereby a cell tissue can be efficiently and quickly proliferated *in vivo* and the onset bacterial infection in an injured part can be avoided in the course of a treatment. More specifically, a closed cell culture system (1) characterized in that a deflection (2) of a tissue on the body surface or inside the body is tightly sealed to form a closed environment free from the invasion of bacteria, etc. and then a solution appropriate for cell culture is circulated in the tissue deflection thus sealed to thereby regenerate the defective tissue; and a method of administering a drug which comprises dissolving a remedy in the perfusion with the use of the above system and thus promoting the treatment of the deflection.

(57) 要約: 本発明の目的は、*in vivo*で効率的な細胞組織の早期の増殖を行うと共に、処置中において損傷部での細菌による感染症の発生を回避した組織細胞培養システムを提供することにある。詳しくは、体表面もしくは体内の組織欠損部 (2) を外部から密閉することにより細菌等の侵入を防御した閉鎖環境となし、当該閉鎖した組織欠損部へ細胞培養に適した溶液を循環させることにより欠損部組織の再生を行うことを特徴とする閉鎖型細胞培養システム (1) であり、当該閉鎖型細胞培養システムを利用して、灌流液中に治療薬剤を溶解させ、欠損部位の治療を促進させる薬剤の投与方法である。



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

閉鎖型細胞培養システム

5 技術分野

本発明は、損傷部位の細胞組織を生体内（*in vivo*）で増殖させ、損傷部位の組織再生を誘導させるシステムに関する。

背景技術

- 10 従来から体損傷部の治療に際しては、損傷部における異物等の不要物を除去した後に、消毒剤等で消毒を行い、治療に適した創傷被覆剤等を損傷部に被覆し、細胞増殖による皮膚の自己再生を図っている。しかしながら、皮膚の自己再生では治癒に時間がかかることや、創傷部での感染症の発生等、種々の克服できない困難な問題が存在する。
- 15 かかる問題点を解決するために、近年再生医工学として、損傷部の近傍の細胞を採取して生体外（*in vitro*）で増殖させて、体外で目的とする組織や臓器を再構築し、それを欠損部に戻す方法、すなわち培養による自家組織移植方法が行われている。例えば、細胞増殖用培地の容器と創傷被覆材システムとを含む細胞培養システムに関するもの
- 20 （例えば、特表2001-507218号公報）、創傷治療に有効な産生物質とヒト繊維芽細胞とを含む培養皮膚代替物に関するもの（例えば、特開2002-200161号公報）、等がある。これらの方法は、いずれも平面的な組織に対する方法としては有効なものであるが、多層細胞（例えば、表皮細胞と真皮細胞の多層細胞）の培養が困難なこと、また細胞の増殖速度が遅いことなど、解決しなければならない問題が種々
- 25 残っている。

さらに、厚い組織については、生体内細胞とは組織構造が異なることや、血管が欠如しているため、酸素あるいは栄養補給の困難さから、細胞の生着率はそれほど高いものとはいえない状況である。加えて、複雑な三次元の立体構造を有する組織、損傷部では困難なものであり、また、
5 処置中における感染症の発生を回避することはできず、従来問題とされている点をいまだ解決するものとはなっていないのが現状である。

したがって本発明は、上記の現状に鑑み、再生医工学において、損傷部、すなわち *in vivo* で効率的な細胞組織の早期の増殖を行うと共に、処置中において損傷部での細菌による感染症の発生を回避した組織細胞培養システムを提供することを課題とする。
10

かかる課題を解決するために、本発明者は鋭意検討を加えた結果、欠損損傷部の傷口において、壊死組織等の不要物を除去した後、細胞増殖の足場となる生体吸収性材料を欠損スペースに埋植して、欠損部を外部から閉鎖させると共に、その閉鎖部分へ細胞培養に適した溶液を循環させれば、その場で効率的に欠損部組織の再生を行うことができることに
15 着目し、本発明を完成させるに至った。

発明の開示

したがって、本発明の基本的な態様である請求項 1 に記載の発明は、
20 体表面もしくは体内の組織欠損部を外部から密閉することにより細菌等の侵入を防御した閉鎖環境となし、当該閉鎖した組織欠損部へ細胞培養に適した溶液を循環させることにより欠損部組織の再生を行うことを特徴とする閉鎖型細胞培養システムである。

25 すなわち本発明は、欠損部そのものを外部から密閉することによる閉鎖型の溶液灌流部とし、細菌からの感染を防御し、その部分へ細胞培養

3

に適した溶液を循環させること、また灌流液の成分を適宜変えることにより、殺菌、細胞培養を連続して行える点に特徴を有するものである。

また、一般的に細胞はある表面に接着することにより分裂して増殖していくことより、細胞増殖には細胞が接着する足場が必要となる。本発

5 明においては、かかる足場として、欠損部に生体吸収性材料を埋植して、細胞増殖を促進させたものである。したがって請求項 2 に記載の本発明は、請求項 1 に記載の発明において、閉鎖環境内に生体吸収性材料を埋植して、欠損部組織細胞の再生を促進させる閉鎖型細胞培養システムである。

10 このような細胞増殖の足場となる生体吸収性材料としては、例えば、ポリグリコール酸繊維、乳酸グリコール酸共重合体繊維あるいはスポンジ、グリコール酸カプロラクトン共重合体繊維、ポリ乳酸繊維あるいはスポンジ、乳酸カプロラクトン共重合体、ポリカプロラクトン繊維、ポリジオキサン繊維、コラーゲン繊維あるいはスポンジ、ゼラチンスポンジ、
15 ジ、フィブリン繊維スポンジ、多糖類繊維あるいはスポンジ、リン酸三カルシウム多孔体ビーズ、炭酸カルシウム多孔体ビーズ、ハイドロキシアパタイト等を挙げることができる。

本発明の閉鎖型細胞培養システムでは、閉鎖環境内における細胞培養には、かかる細胞増殖が効果的に行われるように、細胞増殖に適した溶液が灌流される。したがって請求項 3 に記載の本発明は、請求項 1 また
20 は 2 に記載の発明において、細胞培養に適した溶液が、自己血から分離した血清、血小板濃厚血清、血液製剤、血小板濃厚血清、血漿分画製剤、血液蛋白分画成分溶液、プラズマエキスパンダー、浸透圧等張輸液、細胞培養培地である閉鎖型細胞培養システムである。

25 さらに請求項 4 に記載の本発明は、循環させる溶液成分を治療段階ごとに変化させることにより、欠損部の鎮痛、消毒、各再生目的組織にと

って適した細胞増殖環境を構築し、プログラム化された閉鎖型細胞培養システムである。すなわち、欠損部における細胞培養を有効的に行うためには、細胞増殖のための閉鎖環境を最も効果的なものに設定する必要がある。したがって、請求項 4 に記載の本発明は、かかる要求に対応で

5 き、欠損部の鎮痛、消毒、各再生目的組織にとって適した細胞増殖環境を容易に構築し得るようにした点に特徴を有するものである。

また、細胞の培養環境は、細胞の培養に伴いその pH 値、炭酸ガス分圧、酸素分圧が種々変化する。したがって、細胞培養に適した溶液の組成を循環させるとしても、閉鎖環境は、常に細胞培養に最適な環境にして

10 おかなければならない。そのためには、センサーで閉鎖環境の培養液内の物理的要因、すなわち pH 値、炭酸ガス分圧、酸素分圧をモニターし、その信号により培養環境の入口側に設けたガス交換器を制御し、リアルタイムで培養液の変化に合わせて閉鎖環境のガス分圧の調整をおこない、細胞培養環境を最適化しておくのが好ましい。そのための請求項 5

15 に記載の本発明は、閉鎖環境の入口サイドに、閉鎖環境の pH 値、炭酸ガス分圧、酸素分圧を測定するモニター装置を具備したガス交換装置を組み込み、モニター装置からの信号に基づき、ガス濃度を自動調整して細胞培養環境を最適化する閉鎖型細胞培養システムである。

また、請求項 6 に記載の本発明は、閉鎖環境内の圧力を持続的あるいは

20 は間欠的に制御させた閉鎖型細胞培養システムである。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、たとえば圧力維持装置により種々変化させることにより、陽圧状態では神経組織等の成長に必要な空間を確保することができ、また陰圧状態では体液の滲出を促し、損傷部表面の細胞増殖をより促進させることが可能となる。さらに間欠的に陰圧に制御することで、閉鎖

25 環境内の体積の一時的な縮小により、均一かつ効率的な閉鎖環境内の環流液の置換を行うことが可能となる。

また、広範囲の重度火傷については、損傷部に重大な体液水分損失が生じることがある。したがって、本発明の閉鎖型細胞培養システムを用いて損傷部の細胞培養を行う場合には、灌流液の浸透圧を火傷による損傷部表面を適切に保つことが可能な浸透圧調整済みの溶液を灌流液として循環させることが必要である。そのための請求項 7 に記載の本発明は、外部に浸透圧調整済みの灌流液を循環させるための回路を設けた閉鎖型細胞培養システムである。

さらにまた、本発明の閉鎖型細胞培養システムを用いて損傷部の細胞培養を行う場合において、損傷部が、神経細胞断裂等の比較的深部の損傷であり、そのような神経細胞培養あるいは血管細胞培養の場合には、低侵襲でのアクセスが望ましい。かかるアクセスのためには、穿刺針の形態を採用するのがよい。したがって、請求項 8 に記載の本発明は、穿刺デバイスとバルーンカテーテルの組合せにより、体腔内深部または臓器内に細胞培養スペースを作る形態である閉鎖型細胞培養システムである。

すなわち、神経組織細胞や血管組織細胞の増殖には、それが増殖するための空隙が確保されていなければならない。そのための空間を作成するのに穿刺針とその内腔を通過するバルーン付カテーテルの組合せで体内の目的部に到達させ、バルーンを拡張することにより目的細胞の増殖に適した空隙を作成させる。またそれにより効果的に損傷部に生体吸収性材料を留置することができる特徴を有するのである。

また、肝臓、脾臓、腎臓などの実質臓器においても同様の方法で培養スペースを設けて目的細胞を各臓器内で培養することにより、機能の低下あるいは不全状態の臓器内で、体外細胞培養技術による細胞培養以上により優れた機能構造を有する細胞を増殖させることができる。

また、本発明は損傷部における細胞培養に際し、効果的に有効な薬剤

6

を投与し得る方法を提供するものである。すなわち、本発明が提供する閉鎖型細胞培養システムにおいては、各細胞の増殖に最適な培地成分への変換や、より治癒を促進させるために細胞増殖因子や、血管増殖因子を灌流液に添加して欠損部を灌流させることができる。したがって、請求項 9 に記載の本発明は、請求項 1 に記載の閉鎖型細胞培養システムを利用して、灌流液中に治療薬剤を溶解させ、欠損部位の治療を促進させる薬剤の投与方法でもある。治療薬剤の変更時に薬剤が混合して不適切な薬剤の配合問題の発生を避けるために、この場合にあっては、閉鎖環境に間欠的に陰圧サイクルを施すことにより、閉鎖環境での細胞培養スペース内を循環する灌流液を積極的に入れ替え、均一かつ効率的な薬剤溶液の交換を行うことができる。

かかる場合に投与し得る薬剤としては、消毒剤、局所麻酔剤、消炎鎮痛剤、抗生物質製剤、末梢血管拡張剤、各種細胞増殖因子製剤、神経増殖因子製剤、血管増殖因子製剤（癌細胞摘出時には、各種細胞増殖抑制因子製剤）、免疫抑制剤等を挙げることができる。

またこれらの薬剤のみならず、各種細胞接着性分子、例えば、フィブロネクチン、ヒドロネクチン等を灌流液中に含有させてもよい。また遺伝子を導入させることもでき、そのような遺伝子としては、ネイキッド DNA、アデノウイルスベクター遺伝子、レトロウイルスベクター遺伝子、リポゾーム埋抱遺伝子、ハイドロゲル埋抱遺伝子等を挙げることができる。

さらに本発明の別の態様としての請求項 10 に記載の発明は、予め自己の細胞を採取し、体外でその細胞を培養増殖させた後に灌流液に懸濁し、灌流システムを通じて閉鎖型培養システムに戻すことにより、損傷部細胞培養からの治療を行うと同時に、体外で培養した組織と複合的に培養増殖、生着を行うことにより損傷部の治癒を促進させる細胞の移送

と増殖方法でもある。

図面の簡単な説明

図 1 は本発明の閉鎖型細胞培養システムを説明するための模式的概略
5 分解図である。

図 2 は体表面に本発明の閉鎖型細胞培養システムをアクセスした概略
断面図である。

図 3 は体内の深部の損傷部である神経細胞断裂における細胞増殖のた
めの本発明のシステムによる細胞増殖の概念を説明する図である。

10 図 4 は体内の深部の損傷部である神経細胞断裂における細胞増殖のた
めの本発明のシステムによる細胞増殖の概念を説明する図である。

図 5 は体内の深部の損傷部である神経細胞断裂における細胞増殖のた
め、本発明のシステムによる細胞増殖の概念の説明図である。

15 図 6 は体内の深部の損傷部である神経細胞断裂における細胞増殖のた
め、本発明のシステムによる細胞増殖の概念の説明図である。

図 7 は本発明の閉鎖型細胞培養システムにより、複数の灌流液を循環
させる場合の模式的な説明図である。

図 8 は本発明の閉鎖型細胞培養システムを、定圧持続吸引器と輸液バ
ックと輸液チューブ回路を利用して灌流液を灌流させる場合の模式的な
20 説明図である。

符号の説明

- | | |
|------|-------------|
| 1 | 閉鎖型細胞培養システム |
| 2 | 体組織欠損部 |
| 25 3 | サージカルフィルム |
| 7 | 埋没生体吸収性材料 |

8

- 2 0 閉鎖型細胞培養システム
- 2 3 被覆フィルム
- 2 4 2 層ディスク
- 2 5 足場生体材料
- 5 2 6 細胞増殖部
- 3 0 穿刺針
- 3 2 バルーン部
- 3 3 生体吸収性材料
- 3 4 2 重ルーメンカテーテル
- 10 4 0 灌流液バッグ
- 4 1 3 方活栓
- 4 2 流量調節
- 4 3 閉鎖型細胞培養器
- 4 4 ポンプ
- 15 4 5 廃棄
- 4 6 患者
- 4 7 p H ガスモニター
- 4 8 ガス交換器
- 5 1 定圧持続吸引器

20

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明が提供する閉鎖型細胞培養システムについて、図面を参照にしながら詳細に説明をして行く。

- 図 1 は、本発明が提供する閉鎖型細胞培養システムを説明するための概略分解模式図である。すなわち、本発明が提供する閉鎖型細胞培養システム（1）は、基本的には、体表面もしくは体内の組織欠損部（2）

を外部から密閉することにより細菌等の侵入を防御した閉鎖環境となし、当該閉鎖した組織欠損部へ細胞培養に適した溶液を循環させることにより欠損部組織の再生を行うことを特徴とする閉鎖型細胞培養システムである。

- 5 より具体的には、本発明が提供する閉鎖型細胞培養システム（１）（図中においては閉鎖状態を解除した、模式的展開図で示してある）は、体表面もしくは体内の組織欠損部（２）を外部から密閉する手段（３）（図中においてはサージカルフィルム等の粘着シート）により細菌等の侵入を防御した閉鎖環境、すなわち、体表面の組織欠損部（２）をサージカルフィルム（３）により被覆密閉することにより閉鎖環境を作り出し、
- 10 その閉鎖した組織欠損部（２）へ細胞培養に適した溶液を灌流液導入チューブ（１０）（図中、矢印Ａ方向）より導入して、灌流液排出チューブ（１１）（図中、矢印Ｂ方向）へ灌流させる。

- 灌流液導入チューブ（１０）よりシステム（１）内に灌流された灌流液は、ディスク２（５）を介して例えば表皮用生体吸収性材料（６）へ浸漬し、浸漬された灌流液がその下方で体組織欠損部（２）へ埋没させた埋没生体吸収性材料（７）にさらに浸漬し、その場で体組織欠損部（２）における細胞に細胞増殖に適した環境を与えることとなり、細胞増殖を効率的に行うこととなる。

- 20 一方、埋没生体吸収性材料（７）を浸漬し、さらに体組織欠損部（２）を満たした灌流液は、ディスク１（４）およびディスク２（５）の間の空域を通過して、ディスク１（４）に設けられた灌流液排出チューブ（１１）より排出され、灌流が完了する。

- 25 なお、システム内に設けたディスク１（４）とディスク２（５）の２層ディスクは、それぞれ灌流液導入チューブ（１０）および灌流液排出チューブ（１１）を保持する機構を有すればよく、またその材料も非透

水性のプラスチック等でチューブと一体で成形することができる。

以上に説明したように、本発明のシステム（１）による体組織欠損部での閉鎖環境内への灌流液の循環により、体組織欠損部には、細胞が接着する足場となる生体吸収性材料により、効率的に細胞増殖を促進させ、
5 細胞増殖が完了した段階では、足場となる生体吸収性材料が分解吸収されており、滅菌状態で体欠損部の組織の再生が行われるのである。

図２に体表面から本発明の閉鎖型組織培養システム（２０）をアクセスした概略断面を示した。すなわち、外傷、火傷、褥瘡などの傷害の場合には、表皮（２１）および真皮（２２）を含め体組織が欠損し、その
10 傷害部が体表面に露出している。この場合には、被覆フィルム（２３）がついた本発明の閉鎖型組織培養システム（２０）の２層ディスク創面アダプター（２４）を傷害面に充て、灌流液を灌流させる。なお、この場合においても、細胞増殖の必要な組織には、細胞増殖を促進させる適当な足場生体材料（２５）として、生体吸収性材料を埋植させて細胞増
15 殖部（２６）を作成させておくのがよい。

この場合にあっては、灌流液は閉鎖型組織培養システム（２０）の中央部に設けた灌流液入口（２８）より灌流されて損傷部に流れ、生体吸収性材料である足場生体材料（２５）につたわり、周辺部に拡散する。その後、周辺部単端（２７）より２層ディスク（２４）の間隙を通り、
20 灌流液出口（２９）より排液として排出される。

したがって、傷害面が密閉状態であることより細菌等からの感染が防止でき、灌流液ならびに足場生体材料により、損傷部での細胞増殖が効果的に行われることとなる。

この体表面へアクセスする本発明の閉鎖型組織培養システムは、個々の傷害部の大きさにあわせ、所望のサイズに設計することができる。したがって、広範囲の火傷などの場合にあっては、２層ディスクを有する
25

本発明の閉鎖型組織培養システムを複数組合せることにより火傷の面積と形状に合わせ、同時に各システムへ灌流液を灌流させ、単独使用の場合と同様の効果を上げることができる。

一方、神経細胞断裂あるいは血管組織の断裂等、体内の比較的深部の損傷部における細胞増殖を行う場合には、低侵襲でのアクセスが望ましいことより、穿刺針の形態の閉鎖型細胞培養システムが使用される。具体的には、神経組織細胞や血管組織細胞増殖のための空隙を穿刺針とその内腔を通過するバルーン付カテーテルの組合せで作成し、そのバルーンで拡張させた部位に足場生体材料を留置させ、灌流用カテーテルにより灌流液を循環することができる。なお、この場合に使用する穿刺針は、柔軟に屈曲することができ、細胞増殖を目的とする損傷部に添ったカテーテルの留置が行えるよう構成されている。

かかる体内の比較的深部の損傷部、例えば、神経細胞断裂あるいは血管組織の断裂等における細胞増殖のための本発明のシステムによる細胞増殖の概念を図3～図6により示した。すなわち図3に示すような穿刺針(30)を用い、皮膚表面より穿刺針を刺し、細胞増殖のための空隙を構築する目的部まで先端を導入させ、穿刺針の先端孔よりバルーンカテーテルを、穿刺針先端を後退させながらカテーテルバルーン部(31)を露出させてバルーン部(32)を膨張させる。

次いで、バルーンの膨張により細胞増殖のための空隙部(組織内スペース)を作成した後、図4に示すように、バルーンを縮小させてバルーンカテーテルのみを抜去する。その後細胞増殖の足場となる生体吸収性材料(33)を穿刺針(30)内腔から挿入する。なお生体吸収性材料は、予めルーメン内に含んでいるカテーテルを、穿刺針を通じて留置することもできる。

細胞増殖の足場となる生体吸収性材料を損傷部に留置し、生体吸収性

12

材料埋入用カテーテルを抜去した後、図 5 に示すように細胞増殖に適する灌流液を灌流させるための、灌流用 2 重ルーメンカテーテル (34) を挿入し、次いで灌流用カテーテル (34) のみを残し、穿刺針を体内より引き抜き、灌流液の入口 (35) と出口 (36) を灌流システムに

5 接続し、灌流を開始する。かかる状態を、図 6 に模式的に示した。

以上記載のように、本発明の閉鎖型細胞培養システムを使用することにより、体表面もしくは体内の組織欠損部を外部から密閉し、細菌等の侵入を防御した閉鎖環境とすることができ、当該閉鎖した組織欠損部へ細胞培養に適した溶液を循環させることで欠損部の細胞増殖を行い、組織の再生を行うことが可能となる。

10

また本発明が提供する閉鎖型細胞培養システムは、循環させる溶液成分を段階ごとの変化させることにより、欠損部の鎮痛、消毒、各再生目的組織にとって適した細胞増殖環境を構築させることもできるものである。例えばそのような手段として、模式的な概念図として図 7 に示すように、細胞培養灌流液の入った複数の容器 (40) (図にあっては 2 個) からその灌流液の種類を切り換えることができる 3 方活栓 (41) を通り、流量調節器 (42) により流量を制御した後、患者 (46) に設けた閉鎖型細胞培養システム (閉鎖型培養器) (43) 内を灌流した後、ポンプ (44) を通って排液容器に灌流後の培養液を廃棄 (45) する

15

20 ことができる。

この場合には、例えば圧力センサーなどを用いてポンプの排出量を制御することができ、それにより細胞増殖を行う目的損傷部の圧力を一定に保つこともできる。

この複数の灌流液を使用する場合においては、単に細胞増殖に適した複数の成分を灌流させるばかりでなく、汚染されている創傷部を消毒する殺菌剤、あるいは細菌類の増殖を抑制させるための抗生物質を初期の

25

段階で灌流させること、さらには、よりよい治癒の促進を目的として各種細胞増殖因子、神経増殖因子、血管増殖因子（癌細胞摘出時には、各種細胞増殖抑制因子）等を含む灌流液を灌流させることができる。

またさらに効果的な治療のために局所麻酔剤、消炎鎮痛剤、抗生物質製剤、末梢血管拡張剤、免疫抑制剤等を含む灌流液を灌流させることができる。

また、細胞の培養環境は、細胞の培養に伴ってその培養環境内部の pH 値、炭酸ガス分圧、酸素分圧が種々変化する。したがって、培養環境である閉鎖環境は、常に細胞培養に最適な環境にしておくことが好ましい。そのためには、センサーにより閉鎖環境の培養液内の物理的要因、すなわち pH 値、炭酸ガス分圧、酸素分圧を測定、モニターするモニター（47）を設け、モニターからの信号により培養環境の入口側に設けたガス交換器（48）を制御し、リアルタイムで培養液の変化に合わせて閉鎖環境のガス分圧の調整をおこない、細胞培養環境を最適化しておくことができる。

本発明が提供する閉鎖型細胞培養システムは、また病院等で常用されている定圧持続吸引器と輸液バックと輸液チューブ回路を利用して細胞培養に適した灌流液を灌流させることもできる。その模式的な概念を図8として示した。なお、図8において、図中の符号は、図7と同一意味を有する。

図8においても、その基本的概念は、図7に示したシステムと同様であり、図7で設けたポンプを通して排液容器に灌流後の培養液を廃棄する部分を、病院等で常用されている定圧持続吸引器（51）に接続した部分が異なるだけである。

以上記載のように、本発明は欠損損傷部の傷口において、壊死組織等の不要物を除去した後、細胞増殖の足場となる生体吸収性材料を欠損ス

ペースに埋植させ、欠損部を外部から閉鎖させると共に、その閉鎖部分へ細胞培養に適した溶液を循環させることにより、その場で効率的に欠損部細胞を増殖させ、組織の再生を行うことができる。

5 実施例

以下に本発明の細胞増殖の具体例を、実施例により説明する。

実施例 1：移植皮膚採取手術後の損傷部の治療

10 採皮手術後の創面からの出血を、フィブリンスプレーを用いて速やかに止血させ、周辺部を消毒した。次いで、凹んだ部分にコラーゲンビーズを充填した後に中心部に穴のあいた連続気泡コラーゲンシートを創面にそって大きめに形を作り創面に被せた。2層アダプターもコラーゲンシートと同様の形にした後に上に重ねて、アダプターの出入り口のみ開孔したサージカルフィルムを被せてコラーゲンビーズとシートの閉鎖スペースを作成した。採皮個所に痛みのある場合は、局所麻酔剤としてキシロカイン、さらに3種混合の抗生物質の入った血漿製剤を閉鎖スペースに循環させ、3時間後に局所麻酔剤と抗生物質溶液を止めて、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）に切り換えて灌流した。

20 別途に真皮層の組織を採取し、体外でウシ胎児血清により細かく浮遊培養した繊維芽細胞を患者の血清と交換し灌流した。その細胞混濁溶液を灌流液バックの下の方活栓より閉鎖型培養器に注入する事により細胞移植を行った。続いて真皮細胞の細胞増殖が終了した時点でbFGFを上皮増殖因子（EGF）に交換して周囲の皮膚表面と均一になるまで上皮細胞を培養した。

25 実施例 2：下肢大腿部断裂神経の神経再構築

体表面の皮膚から柔軟に曲げることのできる穿刺針を、神経の断裂個

15

所両端の神経に届くように穿刺する。バルーン長が神経両断端に届く長さのものを選び、バルーンカテーテルを、穿刺針を通じて挿入してバルーンを膨張させ、神経の断端間に空隙を作る。

- 5 その空隙に神経成長の足場となる平行コラーゲン繊維束をルーメン内に収納したカテーテルより挿入する。さらにこのカテーテルを灌流用細径カテーテルと交換し穿刺針を抜き取り灌流用カテーテルのみを留置する。

患者の血液より得た血清に神経増殖因子を 10^{-8} モル加え、灌流を開始し、内部の空気が出終わった時点で循環回路に切り換える。

- 10 灌流時に神経断端間のスペースがつぶれないように、弱い陽圧を維持する。細胞が十分に成長した時点で灌流用カテーテルを抜き取り、完了する。

実施例 3：重度の火傷の治療

- 15 腹部に対する重度の火傷に対して皮膚と死滅組織等を切除した後に、コラーゲン繊維シートで火傷創面を覆い、さらにその上に 2 層灌流アダプターを取りつける。最初にポピドンヨード液を含む等張血漿増量製剤により創面を消毒する。

- 20 浸透圧を火傷創面と同等にしたヒト血漿製剤を患者の創面からの体液損失を抑制する為に灌流させる。また感染を予防する為に抗生物質注射液を加えて、さらに患者が痛みを訴える様であれば、局所麻酔剤であるキシロカインを灌流液に注入して鎮痛をおこなう。

- 患者の状態が安定した後にキシロカイン、抗生物質の投与を中止して繊維芽細胞増殖因子 (b F G F)、血小板由来細胞増殖因子 (P D G F)、
25 表皮増殖因子等の細胞増殖因子を灌流液に加える。創面の表皮が十分に増殖した時点でこの閉鎖型細胞培養器を取り外し、創面を外気に触れさ

16

せながら、残りの自然治癒を待つ。

実施例 4 :

- ウサギ肝臓に穿刺針付きのカテーテルイントロデューサーを、超音波
- 5 断層画像を見ながら穿刺する。イントロデューサーシースを残して穿刺針を抜去し、代わりにフォガティー血栓除去用バルーンカテーテルを挿入し、径が 2 c m 程度となるまでバルーンを膨張させて肝臓内に細胞培養スペースを確保した。バルーンを縮小させた後、そのフォガティーカ
- 10 テーテルを抜き取り、綿状のコラーゲン繊維ペレットの入ったテフロンチューブを培養スペースに挿入し、コラーゲン繊維ペレットを充填した。コラーゲン挿入用のテフロンチューブを抜き去り、灌流用の 2 重ルーメンの灌流口が培養スペースに位置するように留置し、カテーテルイントロデューサーシースも抜去して 2 重ルーメンカテーテルのみを残し、縫
- 15 合により皮膚に固定し、同時にカテーテル創外固定用のフィルムで固定した。

当該ウサギの血液より調製した血清を細胞培養スペースに灌流させつつ、30 日間ウサギ肝臓内で肝細胞の培養を行った。

30 日の処理後、ウサギを屠殺し、処理肝臓の剖検の結果、コラーゲン繊維内に肝臓細胞の増殖が認められた。

20

産業上の利用の可能性

- 以上記載のように、本発明の閉鎖型細胞培養システムにより、欠損部を外部から閉鎖させることにより細菌からの感染を防御し、その閉鎖部分へ細胞培養に適した溶液を循環させることにより、その場で効率的に
- 25 欠損部細胞を増殖させ、組織の再生を行うことができる利点を有している。

また、灌流液を種々変化させることにより、細胞増殖因子、あるいは治療用薬剤を効果的に目的の部に投与することができ、より効果的な組織再生を確保し得る利点を有している。

請求の範囲

1. 体表面もしくは体内の組織欠損部を外部から密閉することにより細菌等の侵入を防御した閉鎖環境となし、当該閉鎖した組織欠損部へ細胞培養に適した溶液を循環させることにより欠損部組織の再生を行うことを特徴とする閉鎖型細胞培養システム。

10

2. 閉鎖環境内に生体吸収性材料を埋植して、欠損部組織細胞の再生を促進させる請求項 1 に記載の閉鎖型細胞培養システム。

3. 細胞培養に適した溶液が、自己血から分離した血清、血液製剤、血小板濃厚血清、血漿分画製剤、血液蛋白分画成分溶液、プラズマエキスパンダー、浸透圧等張輸液、細胞培養培地である請求項 1 または 2 に記載の閉鎖型細胞培養システム。

15

4. 循環させる溶液成分を治療段階ごとに変化させることにより、欠損部の鎮痛、消毒、各再生目的組織にとって適した細胞増殖環境を構築してプログラム化された請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の閉鎖型細胞培養システム。

20

5. 閉鎖環境に接続した回路に、閉鎖環境の pH 値、炭酸ガス分圧、酸素分圧を測定するモニター装置を接続したガス交換装置を組み込み、モニター装置からの信号に基づき、ガス濃度を自動調整して細胞培養環境を最適化する請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の閉鎖型細胞培養システム。

25

19

6. 閉鎖環境内の圧力を持続的あるいは間欠的に制御させた請求項 1 に記載の閉鎖型細胞培養システム。

7. 外部に浸透圧調製済みの灌流液を灌流させるための回路を設けた
5 請求項 1 に記載の閉鎖型組織培養システム。

8. 穿刺デバイスとバルーンカテーテルの組合せにより、体内深部または臓器内に細胞培養スペースを作る形態である請求項 1 または 2 に記載の閉鎖型細胞培養システム。

10

9. 請求項 1 に記載の閉鎖型細胞培養システムを利用して、灌流液中に治療薬剤を溶解させ、欠損部位の治療を促進させる薬剤の投与方法。

10. 予め自己の細胞を採取し、体外でその細胞を培養増殖させた後
15 に灌流液に懸濁し、灌流システムを通じて閉鎖型細胞培養システムに戻し、損傷部細胞培養の治療を行うと同時に、体外で培養した細胞を加えることにより、複合的に細胞培養増殖、生着を行うことを特徴とする損傷部の治癒を促進させる細胞の移送と増殖方法。

20

図 1

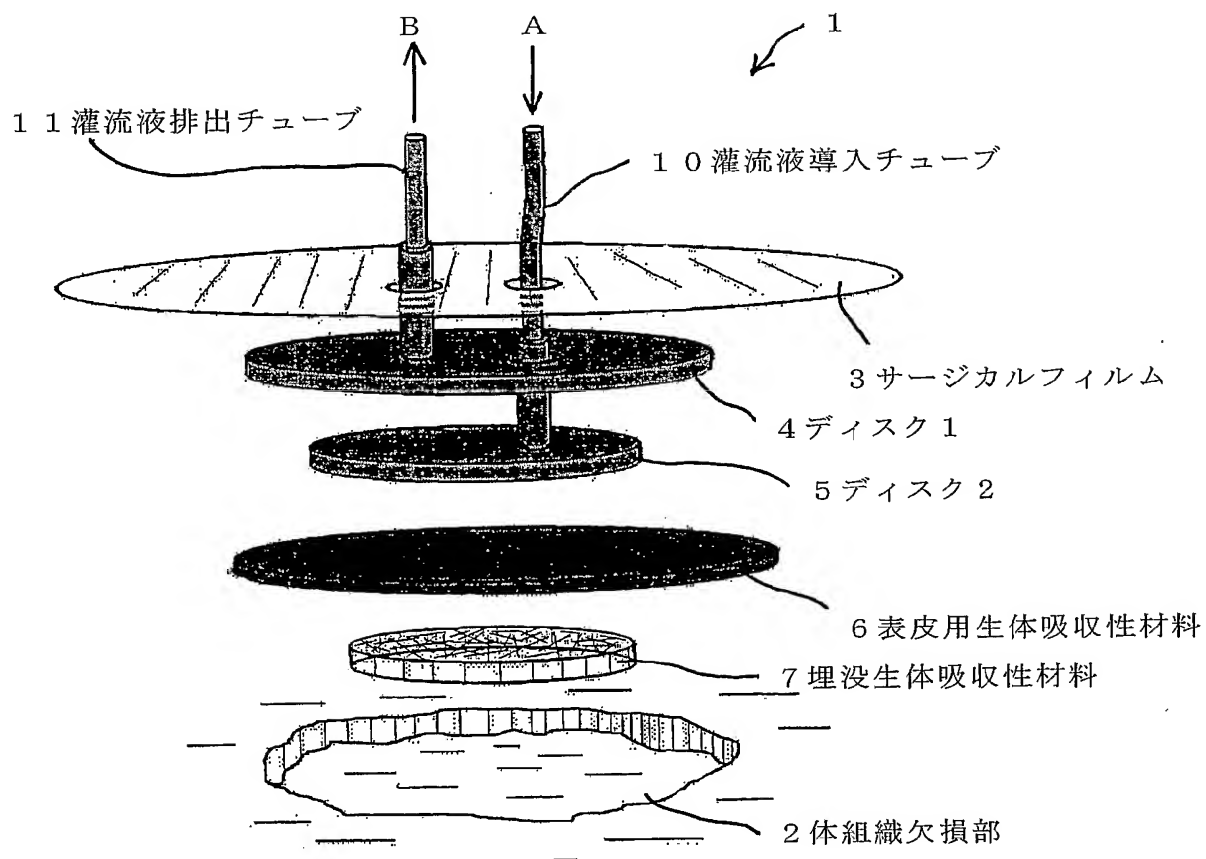


図 2

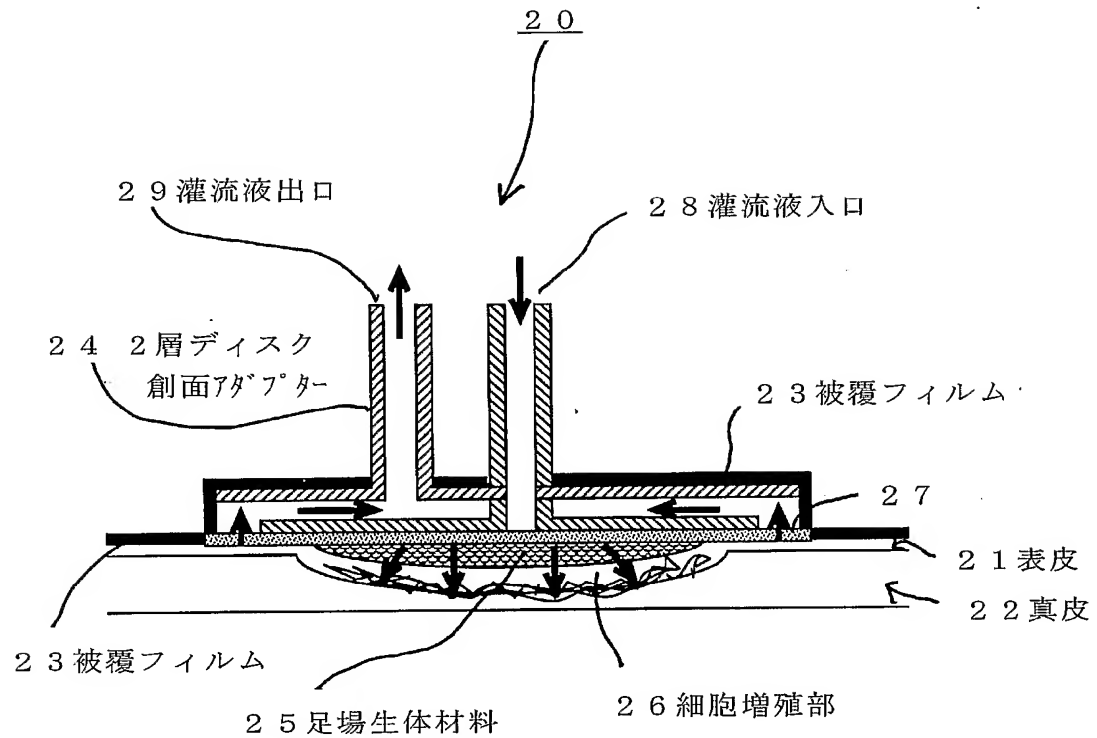


図 3

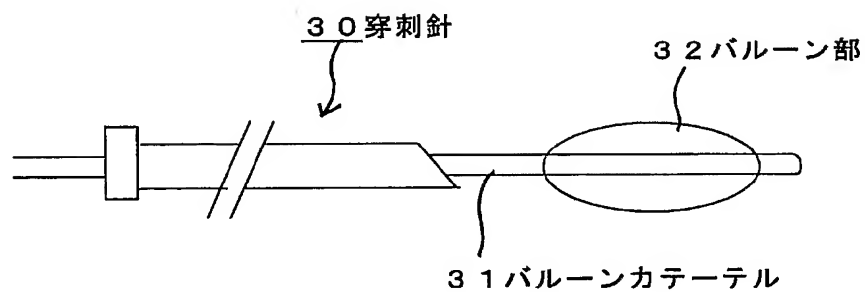


図 4

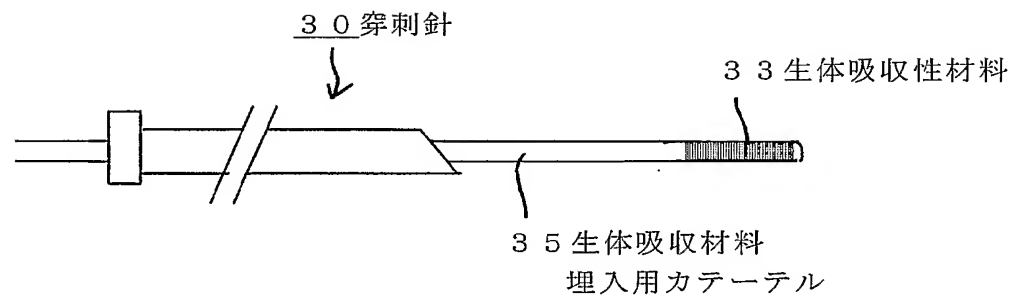


図 5

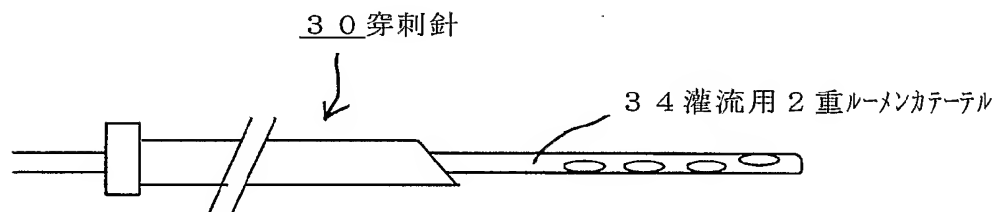


図 6

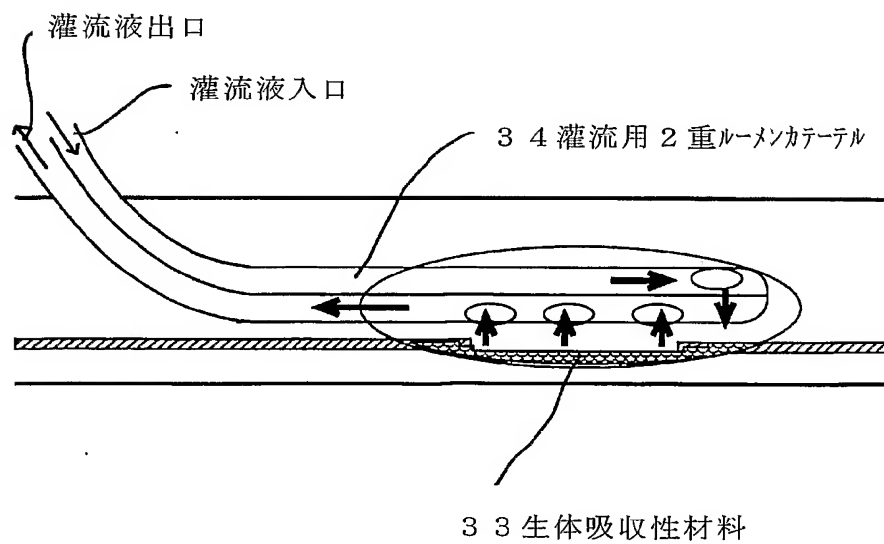


図 7

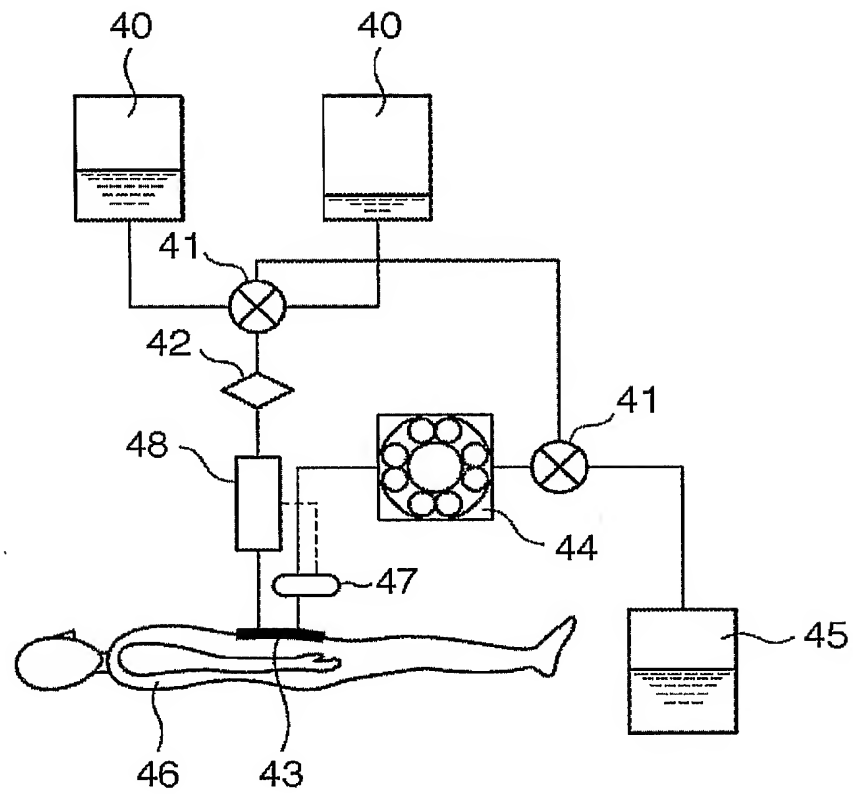
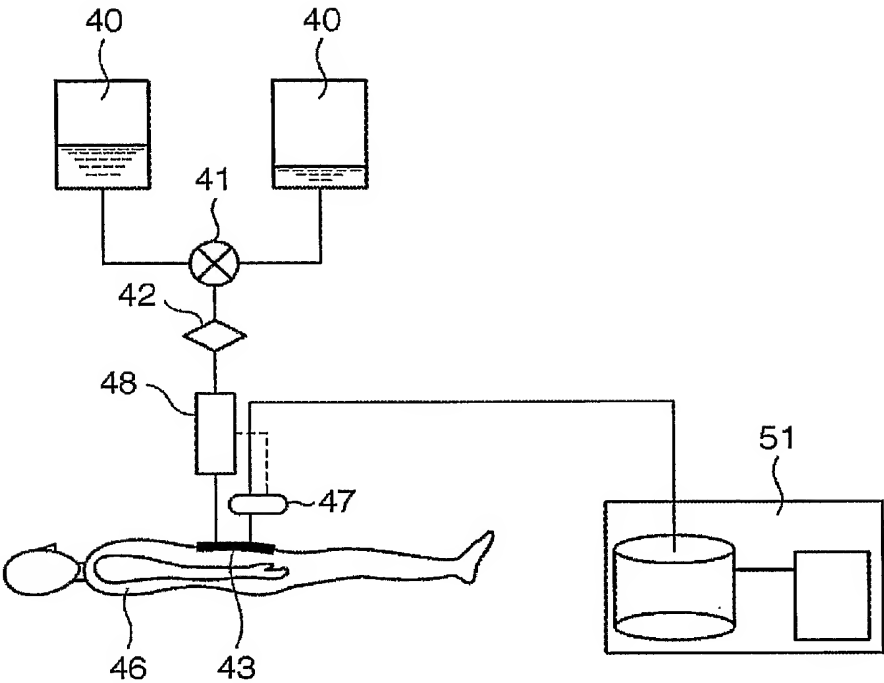


図 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02501

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61L27/38 // C12N5/00, C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61L27/38 // C12N5/00, C12M3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1926-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN), WPI/L (QUESTEL), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 95/31157 A1 (THM BIOMEDICAL, INC.), 23 November, 1995 (23.11.95), Claims 73, 79; page 7, lines 19 to 23; page 28, lines 18 to 28 & AU 9525905 A & EP 759731 A1 & JP 10-500589 A & US 5855608 A & US 5981825 A	1-4 5-7
X Y A	WO 99/07276 A2 (THERAPEUTIC MICRODIALYSIS CORP.), 18 February, 1999 (18.02.99), Claims 21, 28; page 55, lines 24 to 29 & AU 9887738 A & US 6030358 A & EP 1009276 A2 & JP 2001-513349 A	1-4 5-7 8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 28 April, 2003 (28.04.03)	Date of mailing of the international search report 20 May, 2003 (20.05.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02501

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2001/0021529 A1 (Takagi Industrial Co., Ltd.), 13 September, 2001 (13.09.01), Claims 9, 26 & WO 01/64848 A1 & JP 2001-238663 A & AU 200136002 A & US 2002/0037586 A1 & US 2002/0098586 A1	5, 6
Y	JP 11-046759 A (Terumo Corp.), 23 February, 1999 (23.02.99), Par. Nos. [0018], [0023] (Family: none)	7
A	WO 01/87271 A1 (DAVID, James, Johnson), 22 November, 2001 (22.11.01), Full text & AU 200153411 A & US 6471685 B1	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02501

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 9, 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 9 and 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02501

Claims 1 to 8

The inventions as set forth in the above claims, a "closed cell culture system" is specified merely by procedures, i.e., "tightly sealing a defection of a tissue on the body surface or inside the body", "circulating a solution appropriate for cell culture" or "regenerating the defective tissue". Therefore, it is unknown whether the claimed inventions are inventions of product or inventions of process.

Provided that these inventions are inventions of process, the inventions according to the above claims of the present case pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

In this report, therefore, an examination was made by referring these inventions as to inventions of product. In this case, the specific structures of the products involved in the above claims cannot be specified. Thus, these claims fail to fulfill the requirement of clearness as defined in PCT Article 6.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/38 // C12N5/00, C12M3/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L27/38 // C12N5/00, C12M3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1926-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2002年
日本国実用新案登録公報	1996-2002年
日本国登録実用新案公報	1994-2002年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/MEDLINE/BIOSIS/EMBASE (STN),
 WPI/L (QUESTEL), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO 95/31157 A1 (THM BIOMEDICAL, INC.) 1995. 11. 23, Claim73, 79、第7頁第19-23行、第28頁第18-28行参照 & AU 9525905 A & EP 759731 A1 & JP 10-500589 A & US 5855608 A & US 5981825 A	1-4 5-7
X Y A	WO 99/07276 A2 (THERAPEUTIC MICRODIALYSIS CORPORATION) 1999. 02. 18, Claim21, 28、第55頁第24-29行参照 & AU 9887738 A & US 6030358 A & EP 1009276 A2 & JP 2001-513349 A	1-4 5-7 8

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 04. 03

国際調査報告の発送日

20.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

岡崎 美穂

4C

3039

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 2001/0021529 A1 (Takagi Industrial Co. Ltd,) 2001.09.13, Claim9, 26参照 & WO 01/64848 A1 & JP 2001-238663 A & AU 200136002 A & US 2002/0037586 A1 & US 2002/0098586 A1	5, 6
Y	JP 11-046759 A (テルモ株式会社) 1999.02.23, 【0018】、【0023】段落参照 (ファミリーなし)	7
A	WO 01/87271 A1 (DAVID, James, Johnson) 2001.11.22, 全文、 & AU 200153411 A & US 6471685 B1	1-7

法第8条第3項（FCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 9, 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
請求の範囲 9, 10 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第 17 条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

○請求項1－8について

上記請求の範囲に係る発明においては「閉鎖型細胞培養システム」に関して、「体表面もしくは体内の組織欠損部を外部から密閉する」、「細胞培養に適した溶液を循環させる」、あるいは「欠損部組織の再生を行う」といった、操作手順による特定がされているのみであり、該請求の範囲に係る発明が、物の発明であるか、方法の発明であるかが不明確である。

仮に方法の発明と解釈した場合、本願上記請求項に係る発明は、治療による人体の処置方法に関するものとなり、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものとなる。

よって本報告においては物の発明と解釈して調査を行ったが、この場合、上記請求の範囲の記載のみでは、該請求の範囲に包含される物が、具体的にどのような構造を有するかを特定できないから、上記請求の範囲は、PCT6条における明確性の要件を欠いている。